

**Untersuchungen der
Serum 5' Nukleotidase bei
progressiver Muskeldystrophie**

Klaus Baier

1978

Aus der Neurologischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. A. Schrader

Untersuchungen der

Serum 5' Nukleotidase bei progressiver Muskeldystrophie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Baier

aus

Sindelfingen

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin an der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. F. Lahoda

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. A. Schrader

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 1978



An dieser Stelle sei es mir erlaubt, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. F. Lahoda für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit zu danken.

In Dankbarkeit und Anerkennung
meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Progressive Muskeldystrophie	
Geschichte	3
Allgemeine Bemerkungen	4
Ätiologie und Pathogenese	7
5'-Nukleotidase	
Allgemeine Bemerkungen	10
Nachweismethoden	12
Methode der Wahl	14
Material und Reagenzienansatz	15
Methodik	16
Gewinnung des Serums	20
Untersuchte Personengruppe	21
Ergebnisse und Bewertung	26
Diskussion	33
Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	37
Lebenslauf	42

Einleitung:

Unter den vielen Krankheiten, denen die heutige Medizin noch immer hilflos gegenübersteht, weil deren Ätiologie und Pathogenese nicht bekannt sind, spielen die progressiv dystrophischen Myopathien eine nicht zu unterschätzende Rolle. Die Erkrankung ist weltweit verbreitet; in der Bundesrepublik wird mit wenigstens 10.000 - 12.000 (3) Erkrankten gerechnet. Das sind zwei Fälle auf 10.000 Einwohner, wovon mehr als die Hälfte vom Typ Duchénne betroffen sein soll.

Den Patienten, deren Intelligenz im Allgemeinen nicht beeinträchtigt ist, deren psychische Entwicklung aber aufgrund der sich progredient verschlechternden Grunderkrankung erheblich beeinträchtigt wird, kann zur Zeit nur mit orthopädischen Hilfsmaßnahmen einschließlich der Krankengymnastik und mit psychischer Führung geholfen werden.

Trotz der vielfältigen verzweifelten Versuche gibt es heute keine effiziente Therapie. So ist es erschütternd, besonders den Leidensweg dieser Kinder, die allerorts in den Behindertenschulen, an den Rollstuhl gefesselt, teils auf fremde Hilfe bei den einfachsten Verrichtungen des täglichen Lebens angewiesen, tapfer ihren Mann zu stehen versuchen und nicht zuletzt ihrer Familien ohnmächtig verfolgen zu müssen. Jede Möglichkeit, und sei sie auch noch so klein, muß wahrgenommen werden, um diesen Leiden entgegenzutreten.

Bereits bei oberflächlicher Durchsicht der Literatur über die Suche nach dem Primärdefekt und der Pathogenese der progressiven Muskeldystrophie stößt man im Rahmen der Hypothese eines Membrandefektes

und einer Permeabilitätsstörung der Muskelzelle, sowie der Bindegewebshypothese öfters auf die 5'-Nukleotidase, einem Enzym, von dem man noch nicht genau weiß, ob es eine entscheidende Rolle bei der progressiven Muskeldystrophie spielt (7, 16).

In dieser Arbeit, die natürlich nur ein winzig kleiner Beitrag an der Aufdeckung der Ätiologie und Pathogenese der progressiven Muskeldystrophie sein kann, soll in diesem Zusammenhang die Bedeutung der 5'-Nukleotidase im Serum untersucht werden.

Geschichte:

Die progressive Muskeldystrophie stellt keine spezifische Erkrankung der Gegenwart dar. So gibt es auf altägyptischen Reliefs Anzeichen, die darauf schließen lassen, daß die Königin von Punt und ihre Tochter (18. Dynastie, 1501 - 1480 v.Chr. aus Abessinien oder dem heutigen Somaliland) an einer Muskeldystrophie gelitten haben. (27)

Die erste genaue Beschreibung der Muskeldystrophie soll auf Charles Bell im Jahre 1831 zurückgehen.

In der Mitte des 19. Jahrhunderts konnte Duchènne mit einem Instrument zur Muskelbiopsie Muskelgewebe gewinnen und eine Vermehrung des Fett- und Bindegewebes im zerfallenden Skelettmuskel feststellen. - Weiter konnte er bereits damals die klinischen Merkmale der Erkrankung schildern: Erstens die proximale Schwäche der Extremitäten mit zunehmender Gehbehinderung, zweitens die Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur (Verdickung durch Einlagerung von Fettgewebe) und drittens die die gesamte Skelettmuskulatur betreffende Atrophie.

Eulenburg und Cohnheim berichteten 1866 in einem Autopsiebericht von einer hypertrophischen Paralyse mit normalem Zentralnervensystem, aber Ersatz der Skelettmuskulatur durch Fettgewebe.

Im Jahre 1872 berichtete Duchènne über die Erbllichkeit, den vorwiegenden Befall von Knaben, das gehäufte Auftreten innerhalb einzelner Familien und die Beschwerdefreiheit der Eltern. - 1884 wurde von W. Erb die Bezeichnung "Dystrophia muscularis progressiva" eingeführt.

Allgemeine Bemerkungen zur progressiven Muskeldystrophie:

Es handelt sich bei den progressiven Muskeldystrophien größtenteils um Erb-leiden, - ganz selten sporadisches Auftreten -, die bei der Beckengürtelform (Duchenne-Typ) im Zeitraum von wenigen Jahren durch fortschreitenden Untergang der Skelettmuskulatur unter adaptiver Fetteinlagerung mit zunehmenden Paresen zur völligen Hinfälligkeit und schließlich im Verlauf einer interkurrenten Infektion der Atemwege zum Tode des Erkrankten führen. Bei den anderen Formen der Muskeldystrophie kann die Prognose quoad vitam glücklicherweise wesentlich besser beurteilt werden.

Dabei ist das Krankheitsbild streng gegen die spinalen Muskelatrophien sowie in geringerem Maße gegen verschiedene Myositiden, Neuritiden, Myotonien und Myasthenien abzugrenzen.

Die einzelnen Formen der Muskeldystrophie, die sich durch Vererbungsmodus, Manifestationsalter, Progredienz und bevorzugt befallene Muskelgruppen unterscheiden, teilt Beckmann (3) nach klinisch genetischen Studien von P.E. Becker und in Anlehnung an die von der Research Group on Neuromuscular Diseases (1968) vorgeschlagenen Klassifizierung gemäß der folgenden Tabelle ein:

Geschlecht	Ermodus	Beginn	Verlauf und Prognose
Beckengürtel- bzw. infantile Formen: Maligner Typ Duchenne	♂	Rezessiv-X-Chromosomal	Innerhalb d. ersten drei Lebensjahre Zwischen 12. u. 15. Lebensjahr gehunfähig, Tod gewöhnlich vor Erreichen des 25. Lebensjahres
Gutartiger Typ nach BECKER und KIENER	♂	Rezessiv-X-Chromosomal	6.-19. Lebensj. Langsamer, mehr gutartiger Verlauf, Gehunfähigkeit im 5. Lebensjahrzehnt, Lebenserwartung leicht verkürzt
Gliedergürtelform oder "limb-girdle"-Typ (LEYDEN)	♂	Rezessiv-Autosomal (uneinheitlich)	2.-40. Lebensj. Verlauf bei frühem Beginn rasch progredient, sonst gutartig. Lebenserwartung verkürzt
Schultergürtel- bzw. Juvenile Formen: Facio-Scapulo-Humerale Muskeldystrophie (LANDOUZY-DEJERINE) bzw. Juvenile Scapulo-Humerale Muskeldystrophie (ERB)	♂	Regelmäßig dominant-autosomal	7.-25. Lebensj. Protrahierter, gutartiger Verlauf, Gehunfähigkeit nur selten, Funktionen kaum vor dem 30. Lebensjahr beeinträchtigt. Lebenserwartung normal
Distale Muskeldystrophien: Myopathia Distalis Juvenililis Hereditaria (BIEMOND)	♂	Dominant	5.-15. Lebensj.) Gutartiger Verlauf, normale Lebenserwartung
Myopathia Distalis Hereditaria tarda (WELANDER)	♂	Regelmäßig dominant	20.-77. Lebensj.)
Progressive Muskeldystrophie vom atrophischen distalen Typ (MILHORAT und WOLFF) bzw. dominant erbl. aszendierende Muskeldystrophie mit Beteiligung der kl. Handmuskeln (BARNES)	♂	Dominant	26.-43. Lebensj.) 35.-50. Lebensj.)
Oculäre Muskeldystrophie (FUCHS, KILLOH u. NEVIN)	♂	Unregelmäßig dominant (?)	bis 60. Lebensj. Verlauf schleierend protrahiert, meist über Jahrzehnte; auf die äußeren Augenmuskeln begrenzt

Klinische Merkmale sind nach Beckmann:

- 1) Der progressive symmetrische Muskelschwund, der niemals eine spontane Besserung aufweist.
- 2) Die Muskelschwäche und Muskelhypotonie mit symmetrischen Funktionsstörungen; schließlich schlaffe Lähmung.
- 3) Abnahme der elektrischen Muskelregbarkeiten, jedoch keine Entartungsreaktion, keine fibrillären und faszikulären Zuckungen und keine Sensibilitäts-, Blasen- und Mastdarmstörungen.
- 4) Die Pseudohypertrophien, d.h. eine scheinbare Vermehrung der Muskelmasse durch eine endo- und perimysiale Fett- und Bindegewebsvermehrung, die oft das Maß einer einfachen Fettgewebs-Vacat-Wucherung übersteigt.
- 5) Erbliche Ätiologie
- 6) Keine Beteiligung des zentralen und peripheren Nervensystems.

Die Diagnostik stützt sich auf klinische, genetische, histologische, elektromyographische und enzymatisch-biochemische Befunde.

Ätiologie/Pathogenese:

Alle bisherigen Therapieversuche der progressiven Muskeldystrophie (15) (4) bis hin zu den heutigen Versuchen mit Vitaminen, Nukleotid-Nukleosid-Gemischen oder STH (Somatotropes Hormon) stellten sich als relativ unwirksam heraus. Eine gezielte Therapiemöglichkeit scheint erst dann entwickelt werden zu können, wenn es gelingt, trotz umfangreicher morphologischer mikroskopisch-anatomischer Kenntnisse die Lücken im Wissen über die Ätiologie und Pathogenese auf genetisch-biochemischer Grundlage zu schließen.

Nach Heyck und Laudahn (15) werden die verschiedensten Forschungsarbeiten zur Ätiologie der progressiven Muskeldystrophie zu sechs Arbeitshypothesen zusammengefaßt.

Die Hypothese der extramuskulären Ursachen geht davon aus, daß die progressive Muskeldystrophie keine primäre Erkrankung der Skelettmuskulatur darstellt, sondern über den Blutweg von außen herangetragen wird. Hierzu werden konkret ein Serumfaktor, der die Permeabilität der Muskelzelle steigern, und ein spezifischer Hemmfaktor des Plasmas, der die Glucoseutilisation der Muskelzelle hemmen soll, angeführt.

Die Hypothese der "Molekül-Erkrankung", worunter eine Erkrankung zu verstehen ist, die auf eine pathologische Änderung der Primärstruktur eines Proteins folgt, wird auf die Feststellung von Hooton (zit.nach 15)

gestützt, daß gereinigte Kreatinphosphokinase (CK) aus dystrophischer Muskulatur der Maus strukturell-molekulare Unterschiede zur CK gesunder Muskulatur zeigt.

Auch neurale Faktoren werden als Arbeitshypothese herangezogen.

So ist die Bedeutung einer intakten Innervation oder neuromuskulären Aktivität für die Biochemie des Muskels seit langem bekannt. Eine Denervierung des Muskels führt zum Anstieg der Enzymaktivitäten des Pentosephosphat-Cyclus, ein Anstieg, der ebenfalls bei der progressiven Muskeldystrophie des Menschen nachgewiesen werden kann. Weiterhin führten Kreuzinnervierungsversuche zur Umkehr des Enzymusters von roten und weißen Muskeln.

Die Enzymopathie, eine Erkrankung, die auf einer direkten oder indirekten Verminderung oder Vermehrung eines bestimmten Enzyms beruht, wird von Heyck und Laudahn genannt, jedoch zugleich verworfen, da bisher noch kein untersuchtes Enzym im frühesten Krankheitsstadium den Verdacht erhärtet hätte.

Die Hypothese eines primären Membrandefektes oder einer primären Permeabilitätsstörung der Muskelzelle basiert hauptsächlich auf dem Enzymefflux aus der dystrophischen Muskulatur, wie er in den prä-klinischen Stadien nachgewiesen werden konnte. Dies könnte auf einer genetisch bedingten falschen Nukleotidsequenz der Membranproteine oder auf einer falschen Phospholipidzusammensetzung der Membran beruhen.

Die Diskussion einer energetisch bedingten Permeabilitätsstörung, wonach an der Muskulatur der Ratte eine Hemmung des oxydativen oder des glykolytischen Stoffwechsels zu einem gesteigerten Efflux von Enzymen führt, leitet zu der von Bourne und Golarz (7) (1) begründeten Bindegewebs-Hypothese über. Diese beiden Autoren konnten 1958/59 mit histochemischen Methoden einen wesentlich erhöhten Gehalt an 5'-Nukleotidase im Bindegewebe von Muskeldystrophikern gegenüber Bindegewebe von normalen menschlichen Muskeln nachweisen. Der fundamentale Defekt sollte dabei an der Muskelzellmembran liegen, wobei durch die Diffusion von Phosphateestern in das Bindegewebe eine adaptive Synthese phosphatesterhydrolysierender Enzyme in Gang gesetzt werden sollte. Die Diffusion dieser Enzyme zur Muskelzelle mit Adsorption an der Membran sowie eine eventuelle Penetration in die Muskelzelle sollte zum Stoffwechselblock und damit zum Untergang der Muskelzelle führen.

1963 zogen Bourne und Golarz (8) in Erwägung, daß die progressive Muskeldystrophie auf einem genetisch bedingten Defekt im Uridin-Nukleotid-Shunt des Muskelbindegewebes beruhen könnte. Dabei führt die Synthese spezifischer Phosphatasen im Bindegewebe zur Zerstörung von Nukleotiden, die ihrerseits essentielle Bausteine dieses Shunts sind. Dies soll über das Versagen der Synthese der Mucopolysaccharide, die die Grundsubstanz des Bindegewebes darstellen, zum Zusammenbruch des Transportmechanismus zwischen Blutkapillaren und Muskelfasern führen. Da die spezifischen Phosphatasen, ganz präzise nur die Nukleotide, nicht jedoch die Di- oder Triphosphate, noch die Nukleinsäuren angreifen, steht die 5'-Nukleotidase im Mittelpunkt des Interesses.

Allgemeine Bemerkungen zur 5'-Nukleotidase:

Die Serum 5'-Nukleotidase wird schon seit einigen Jahren in der Klinik dazu benutzt, um bei erhöhter alkalischer Phosphatase zwischen einer Leberstörung, bei der die 5'-NTD ebenfalls erhöht ist, und verschiedenen Knochenerkrankungen, durch deren Osteoblastenaktivität die alkalische Phosphatase stark, die 5'-NTD dagegen nicht erhöht sind, zu differenzieren. Darüber hinaus kann sie zur Diagnose von bösartigen intrahepatischen Obstruktionen, hepatobiliären Störungen, Lebermetastasen, Pericholangitis, Intoxikationen, Fettleber und cardialer Stauung herangezogen werden (2) . Ebenfalls erhöht ist sie bei Glomerulonephritis und bei Plasmocytom (23) .

Die 5'-Nukleotidase (5'-ribonucleotide phosphohydrolase) ist eine spezifische Phosphatase, ein ubiquitäres Enzym (17) , das spezifisch im Nukleinsäurestoffwechsel 5'-Nukleotide zu Nukleosiden und anorganischem Phosphat abbaut. Hardonk (14) vermutet in seiner Arbeit über die 5'-Nukleotidase eine Kontrollfunktion des Enzyms bei der Nukleinsäuresynthese.

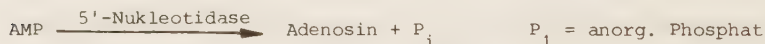
Unter der 5'-Nukleotidaseaktivität versteht man per Konvention die Phosphataseaktivität gegen 5'Adenosinmonophosphat bei pH 7,5 (23) . Damit wird sie von anderen Phosphatasen abgegrenzt, die nur geringe Spezifität bezüglich der Position des Phosphatesters und der Natur des Alkohols besitzen und neben den Purin- und Pyrimidinnukleotiden auch Zuckerphosphate und Phosphatidsäuren spalten (9) , was zumindest für die saure und alkalische Phosphatase zu berücksichtigen ist.

Bei dem definierten pH-Optimum von 7,5 stellt sich das Problem für die saure Phosphatase mit ihrem pH-Optimum von 4,5 - 6,0 weniger. Die alkalische Phosphatase mit ihrem pH-Optimum von 7,0 - 8,0 muß jedoch selektiv gehemmt oder gesondert bestimmt werden. Nicht zuletzt diese notwendige Differenzierung dürfte für die technischen Schwierigkeiten verantwortlich sein, weshalb die 5'-Nukleotidasebestimmung noch kein Routineverfahren darstellt. So ist an der Vielzahl von Nachweismethoden und den fortdauernden Meinungsverschiedenheiten der einzelnen Autoren über die kleinsten Modifikationen abzuleiten, daß bis heute noch keine gänzlich befriedigende Methode entwickelt wurde, die ohne Schwierigkeiten nachzuvollziehen wäre.

5'-Nukleotidasenachweis-Methoden:

Allen Nachweismethoden der Serum 5'-Nukleotidase gemeinsam ist die selektive Hemmung der spezifischen (5'-Nukleotidase) oder unspezifischen Phosphatase (z.B. alkalische Phosphatase), die dann von der Gesamtaktivität subtrahiert werden müssen.

Die Methoden von Dixon und Purdom (13) und Campbell (10) beruhen auf dem Nachweis von anorganischem Phosphat, das durch die 5'-Nukleotidase aus 5'Adenosinmonophosphat (AMP) freigesetzt wird:



Diese beiden Methoden leiden jedoch nach Beckmann (2) unter der methodischen Ungenauigkeit der relativ umständlichen Phosphatbestimmung, den häufigen Pipettiervorgängen und der bei Dixon und Purdom besonders langen Inkubationszeit von 2 1/2 Stunden.

Die Methoden von Persijn (23, 24, 25, 26), Belfield (5) und Beckmann (17) sind eine Fortentwicklung der beiden obigen Verfahren, indem sie den von Kalckar vorgeschlagenen UV-Test verwenden:



Das freigesetzte Ammonium wird dann bei Persijn und Belfield nach der Indophenolblau-Reaktion von Berthelot photometrisch bei 625 bzw. 630 nm bestimmt.

Die Methoden von Belfield und Persijn unterscheiden sich im Wesentlichen nur durch den Zusatz von β -Glycerophosphat anstelle von Orthophenylphosphat zur Hemmung der alkalischen Phosphatase und der Verwendung des Puffers. In der von Beckmann beschriebenen Methode muß nach Vorinkubation über 4 Minuten der Extinktionsabfall pro Minute bei 265 nm gemessen werden. Der Leerwert entfällt, dafür muß in einem Parallelwert die alkalische Phosphatase bestimmt werden.

Der bei 265 nm bestimmte Extinktionsabfall ist jedoch relativ gering, so daß daraus bereits wieder Ungenauigkeiten resultieren (31) .

In einer komparativen Studie tragen Price, Hill und Sammons (28) die Variationskoeffizienten der gebräuchlichsten 5'-Nukleotidase-Bestimmungsmethoden zusammen. Danach schneidet die Methode von Persijn mit einem Variationskoeffizienten von 2,1 gegenüber der Methode von Belfield mit einem Variationskoeffizienten von 7,4 wesentlich besser ab, so daß die Wahl auf die Methode von Persijn et al. fiel.

Methode der Wahl:

Die Methode von Persijn et al. (23) wird unter Berücksichtigung der späteren Berichtigungen und Ergänzungen (24) (25) (26) bis auf zwei kleine Änderungen in Punkt 4) und 7) des Reagenzienansatzes genauestens übernommen.

Die Änderungen wurden durch Schwierigkeiten bei der Beschaffung der Originalreagenzien nötig. So wurde eine gegenüber der von Persijn verwendeten Natriumhypochloritlösung etwa 8fach konzentrierte Lösung verwendet und die Mengenverhältnisse stöchiometrisch umgerechnet. Die Verwendung des EDTA-Dinatriumsalzes anstelle des von Persijn verwendeten Dikaliumsalzes bleibt ohne Bedeutung, da später ohnehin im alkalischen (Na-)Milieu gearbeitet wird.

Material und Methode:

a) Reagenzien-Ansatz:

1) Puffer-Lösung

Löse 4,2 g Natriumdiäthylbarbiturat (5,5 Diäthylbarbitursäure Natriumsalz p.A., $C_8H_{11}N_2NaO_3$) Merck Art. 6318 und 6,3 g Magnesiumsulfat ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) Merck Art. 5886 in 800 ml Wasser. Stelle den pH-Wert mit inormaler HCL, Merck Art. 9057, auf pH 7,5 und verdünne mit Wasser auf 1000 ml.

2) Adenosindesaminase (ADA) vom Kalb in 50 %igem Glycerol, Boehringer Bestell-Nr. 15069 EAAT 2 mg/ml (Stabil bei 4°C für mindestens 1 Jahr). 0,1 ml ADA-Glycerol werden mit 150 ml Pufferlösung verdünnt.

3) ADA-Puffer-AMP-Lösung

Löse 0,25 g Adenosin 5'Monophosphat (AMP) kristallisiertes Dinatrium-Salz ($C_{10}H_{12}O_7N_5PNa_2 \cdot 6H_2O$, MG 499,2) Boehringer Best.Nr. 15015 NAAB und 0,215 g Phenylidinatriumorthophosphat (Phenylphosphat Dinatrium-Salz p.A., $C_6H_5Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$) Merck Art. 3108 in 100 ml ADA-Puffer-Lösung. (Die Lösung wird vor Gebrauch frisch angesetzt.)

4) Äthylendinitrolotetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$, Titriplex III, Merck Art. 8418 (Die Verwendung von EDTA-Dinatriumsalz anstelle von EDTA-Dikaliumsalz ist zu vernachlässigen, da später im alkalischen Milieu gearbeitet wird.) Löse 5,6 g $EDTA \cdot H_2O$ in Wasser und verdünne auf 50 ml.

5) Phenol-Farbreagenz (konz.)

Löse 50,0 g Phenol (C_6H_5OH p.A.) Merck Art. 206 und 0,25 g Nitroprussid-Natrium (Dinatriumpentacyanonitrosylferrat (II)- $Na_2 Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$) Merck Art. 6541 und verdünne auf 1 Liter mit Wasser. (Stabil für 2 Monate, wenn dunkel und kühl gelagert)

6) Phenol-Farbreagenz/EDTA-Lösung

Verdünne 1 Teil konzentriertes Phenol-Farbreagenz mit 4 Teilen Wasser. Zu 100 ml dieser Lösung werden 2 ml EDTA-Lösung zugefügt. (Diese Lösung muß unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.)

7) Alkalische Hypochloritlösung (konz.)

Löse 25,0 g NaOH-Plättchen reinst, Merck Art. 6498, in 60 ml Wasser. Hinzufüge 9 ml kommerzielle Natriumhypochlorit-Lösung ($NaClO$), die 150 g aktives Chlor/l $NaClO$ enthält, $NaClO$, Wienand AG, 5 Köln 41, Postfach 416948, bezogen über Dr. Bender u. Hobein GmbH, 8 München 2, Lindwurmstr. 71, und verdünne auf 1 Liter. (Die Lösung muß mindestens 0,07 N gegen J_2 sein und sollte unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.)

8) Alkalische Hypochlorit-Lösung (verdünnt)

Verdünne 1 Teil konzentrierte alkalische Hypochlorit-Lösung mit 4 Teilen Wasser.

(Die Lösung muß unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.)

9) Adenosin-Stammlösung

Löse 100 mg Adenosin kristallisiert ($C_{10}H_{13}N_3O_4$, MG 267,2) Boehringer Best.Nr. 15013 NAAL in gesättigter Benzoesäure ($C_7H_6O_2$ P.A.) Merck Art.136 und verdünne in Wasser auf 100 ml.

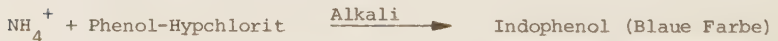
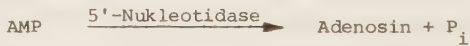
(Diese Lösung ist im Kühlschrank für einige Monate stabil.)

10) Adenosin-"working"-Standard (0,74 mMol/l)

Verdünne 2,0 ml Adenosin-Stammlösung mit Wasser auf 10 ml.

b) Methodik:

Wie bereits oben erwähnt, beruht die Nachweismethode von Persijn et al. auf dem Ammoniaknachweis nach Berthelot, wobei das Ammoniak nach Kalckar in einer Hilfsreaktion über die Adenosindesaminase (ADA), die Adenosin in Inosin und Ammoniak spaltet, gewonnen wird:



P_i = anorganisches Phosphat

Für den Test werden die Reagenzgläser (Plastik-Einmalgläser) mit den oben angegebenen Reagenzien nach folgendem Schema beschickt:

	Puffer ADA-Lsg.	Puffer ADA AMP-Lsg.	Adenosin-working Standard	Serum
Probe	--	1,0 ml	--	0,1 ml
Probenleerwert	1,0 ml	--	--	0,1 ml
Standard	1,0 ml	--	0,1 ml	--
Standard- Leerwert	1,0 ml	--	--	--

Danach werden die Testansätze sorgfältig vermischt und geschüttelt und für 60 Minuten in ein Wasserbad von 37°C gestellt. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit werden pro Reagenzglas 5 ml Phenol-Farbreagenz-EDTA-Lösung und unmittelbar darauf 5 ml der verdünnten alkalischen Hypochlorit-Lösung zugegeben.

Da zwischen den beiden Schritten möglichst wenig Zeit vergehen soll und eine gute Vermischung wichtig ist, werden die Lösungen mit vorher geeichten Einmalspritzen unter Druck zugegeben. Dabei ist die Schaumbildung in den Gläsern mit Serum jedoch so gering wie möglich zu halten. Auf keinen Fall darf der Ansatz überschäumen.

Nach weiteren 30 Minuten, die die Reagenzgläser noch im Wasserbad bei 37°C verbleiben, wird die Absorption der Proben und des Standards gegen die jeweiligen Leerwerte im Photometer bei 625 nm unter Verwendung von 1 cm Quarzküvetten mit 3,12 ml Endfüllvolumen gemessen.

In diesem Fall kam ein Spektralphotometer vom Typ PMQ 3 der Firma Zeiss, Oberkochen, zur Anwendung.

Die Aktivität der 5'-Nukleotidase wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_x}{A_s} \cdot c_s \cdot 16,7 = \text{U/l Serum und Minute oder mU/ml Serum und Minute}$$

A_x = Absorption der Probe gegen den Probenleerwert

A_s = Absorption des Standards gegen den Standardleerwert

c_s = Konzentration des Standards in $\mu\text{M/ml}$

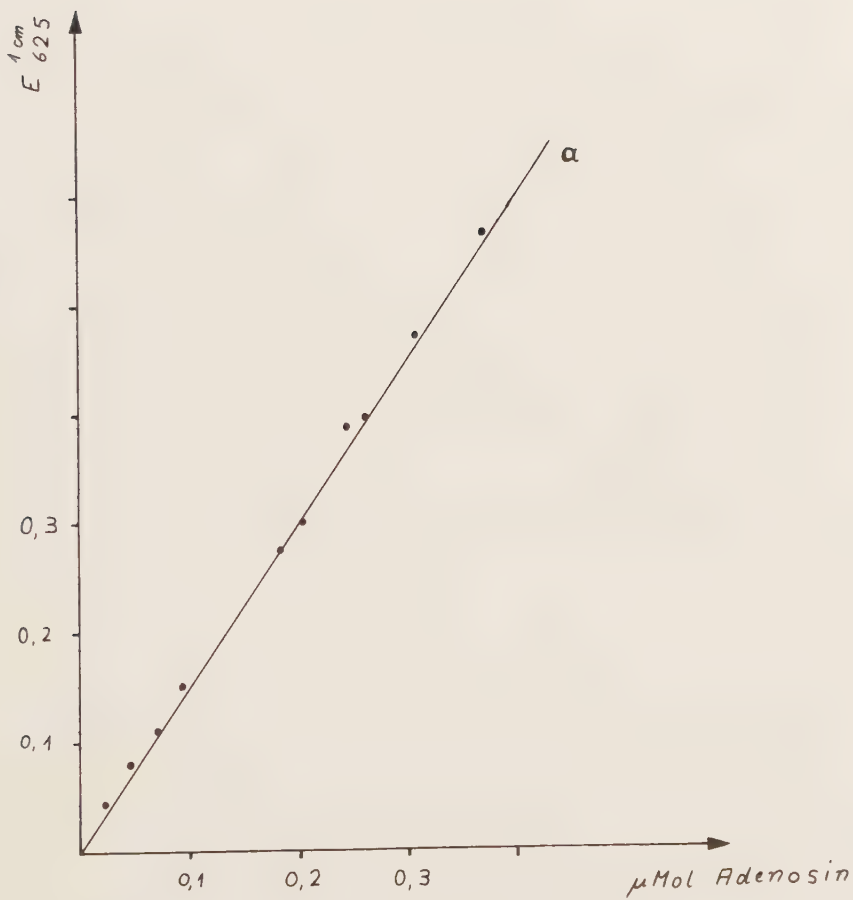
Der Faktor $16,7 = 0,1 \cdot \frac{10\ 000}{60}$ erklärt sich wie folgt:

Das Volumen der Serumprobe beträgt 0,1 ml; da die Aktivität aber in U/l Serum angegeben wird, muß mit 10 000 multipliziert werden. Da unsere Inkubationszeit 60 min. beträgt, die Aktivität aber in U/min. angegeben wird, muß noch mit 60 dividiert werden.

Die Übereinstimmung des Versuchsaufbaues mit dem von Persijn et al. Beschriebenen kann anhand der von diesen Autoren angegebenen Eichkurve (23, Fig. 2) überprüft werden. Dazu wird aus dem Adenosinstandard eine Verdünnungsreihe angesetzt und nach der Hilfsreaktion von Kalckar bestimmt. Damit wird der gesamte Test mit Ausnahme der durch die 5'-Nukleotidase des Serums gesteuerten Reaktion mit vorgegebener Adenosinkonzentration durchgeführt.

Die hierzu ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengetragen:

Adenosinkonzentration in μ Mol	Nach Persijn et al. vorgegebener Wert der Absorption	gemessene Absorption
0,374	0,555	0,567
0,31	0,465	0,473
0,264	0,396	0,397
0,246	0,369	0,388
0,205	0,307	0,302
0,185	0,277	0,277
0,092	0,138	0,152
0,074	0,111	0,115
0,046	0,069	0,080
0,023	0,034	0,039



Eichkurve von Persijn et al. (a)

Eigenmessungen (•)

Gewinnung des Serums und Verarbeitung:

5 - 10 ml Venenblut wurden bei Raumtemperatur ($18 - 22^{\circ}\text{C}$) für 1 bis max. 2 Stunden, vor direkter Sonne und Wärme geschützt, stehengelassen. Nach Ablauf der Spontangerinnung und Abdrängen des Blutkuchens von der Reagenzglaswand wurde für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Danach wurde das überstehende Serum dekantiert und nochmals bei 3000 U/min für weitere 10 Minuten zentrifugiert und erneut dekantiert. Die Proben wurden größtenteils bei 4°C im Kühlschrank (2) aufbewahrt und innerhalb der beiden nächsten Tage bestimmt oder bei -20°C eingefroren (31) und später bestimmt. Die Ergebnisse der eingefrorenen Proben sind mit ⁺) gekennzeichnet.

Für alle Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert angegeben.

Untersuchte Personengruppe:

- gesunde Probanden:

Zur Bestimmung der Normalwerte wurden 10 Freiwillige im Alter von 17 - 54 Jahren herangezogen, die keine klinischen Hinweise auf eine Lebererkrankung oder Glomerulonephritis erkennen ließen und sich in einem sehr guten körperlichen Allgemeinzustand befanden. Aufgrund der von Belfield und Goldberg beobachteten niedrigeren 5'-Nukleotidase-werte bei Kindern in der Altersgruppe 1 - 16 Jahre (6), wurden für die Altersgruppen 6 - 10 und 11 - 16 Jahre ebenfalls die Normalwerte bestimmt, da der größte Teil der untersuchten Patienten in diese beiden Gruppen einzuordnen ist. Bei den untersuchten Kindern handelt es sich um ambulante Patienten der Universitätskinderklinik, die ebenfalls keine klinischen Hinweise auf Leber- oder Nierenschädigungen boten. Eine Auswahl der Probanden fand nicht statt.

- Patienten mit Muskeldystrophie:

Bei den untersuchten 22 Patienten mit progressiver Muskeldystrophie, den 2 Patienten mit Verdacht auf eine Muskelatrophie nach Kugelberg-Welander und dem 1 Patienten mit einer spinalen Muskelatrophie nach Duchênne-Aran handelt es sich um Schüler der Landesschule für Körperbehinderte in München, der Schule für Körperbehinderte in Sindelfingen und um ambulante Patienten der Neurologischen Universitätsklinik München ohne Anhalt für einen Leberschaden oder eine Glomerulonephritis. Die Patienten wurden nach klinischen Gesichtspunkten in folgende, von Beckmann (3) vorgeschlagene Krankheitsgrade eingestuft:

Grad	Klinische Charakterisierung
0	Klinisch unauffällig, erhöhte Serumfermentwerte (CK, Aldolase)
1	Leichte Muskelschwäche mit Neigung zum Stolpern und Fallen. Springen nicht möglich.
2	Anomalie in Haltung (Lordose) und Gang (Watscheln). Treppensteigen ohne Hilfe möglich. Hebetätigkeit erschwert.
3	Watschelangang. Treppensteigen nur mit Hilfe des Geländers möglich.
4	Gehen ohne Hilfe möglich; Treppensteigen trotz Zuhilfenahme des Geländers mühsam und sehr langsam.
5	Schwer ausgeprägter Watschelangang. Treppensteigen und Aufstehen vom Stuhl unmöglich.
6	Schwerfälliges Gehen mit Unterstützung und Aufrichten über "Vierfüßler-Stellung" möglich.
7	Im Rollstuhl. Verrichtungen des täglichen Lebens können im Rollstuhl und im Bett ohne Hilfe ausgeführt werden.
8	Im Rollstuhl. Sitzhaltung noch möglich. Verrichtungen des täglichen Lebens nur mit fremder Hilfe ausführbar.
9	Nur noch begrenzt rollstuhlfähig. Auf vielfältige Hilfe angewiesen.
10	Ständig bettlägerig. Sitzen unmöglich. Minimale Verrichtungen des Lebens nur mit fremder Hilfe ausführbar.

Nach Beckmann

Zur weiteren Abgrenzung des Krankheitszustandes wurden so weit wie möglich die zur Beurteilung der Muskeldystrophien besonders wertvollen Blutenzyme (15, 18, 20, 30) wie die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Kreatinphosphokinase (CK), Lactatdehydrogenase (LDH) und Aldolase bestimmt. In der folgenden Tabelle werden die Einzelangaben über die Patienten zusammengefaßt:

Tabelle 3

Nr.	Alter	Geschlecht (m./w.)	Diagnose	Krankheits- stadium	GOT (4,5-	GPT 12)	CK (-50)	akt. LDH (-195)	ALDO (0,9-
1	70	m.	facio- scapulo- humeral	gehfähig					
2	51	m.	spin.n. Duchénne- Aran	gehfähig					
3	18	m.	V.a.Kugelberg -Welander	4					
4	58	m.	facio- scapulo- humeral	gehfähig					
5	50	m.	facio- scapulo- humeral	gehfähig					
6	31	m.	V.a. Limbe- Girdle	7					
7	17	m.	Duchénne	7/8	29,5	40,3	738	--	--
8	17	m.	V.a. Limbe- Girdle	7	12,0	13,1	129	--	--
9	10	m.	Duchénne	7/8	24,9	43,3	743	397	8,82
10	9	m.	Duchénne	7	41,7	65,5	896	494	18,02
11	9	w.	V.a. Limbe- Girdle	7/8	28,4	36,7	765	--	--
12	10	m.	Duchénne	7	32,9	35,5	864	--	--
13	10	w.	V.a. distale Muskeldystr.		15,8	15,4	63	--	--
14	9	m.	Duchénne	7	56,1	108	1921	--	--
15	9	m.	Duchénne	7/8					
16	11	m.	Duchénne	7/8					
17	13	m.	Duchénne	7/8	39,6	60,7	772	--	--
18	14	m.	Duchénne	7/8	47,7	67,8	1161	--	--
19	13	m.	V.a. Limbe- Girdle	7	13,7	13,5	79	--	--
20	16	w.	V.a. Limbe- Girdle	7					

Fortsetzung von Tabelle 3

Nr.	Alter	Geschlecht (m./w.)	Diagnose	Krankheitsstadium	GOT (4,5-12)	GPT (-50)	CK akt. (-195)	LDH (0,9)	ALDO
21	15	w.	V.a. Limbe- Girdle	7/8	7,9	6,4	13,5	--	--
22	15	m.	Duchénne	7/8	23,7	26,6	378	--	--
23	16	m.	Duchénne	4	57,1	66,5	1263	--	--
24	14	m.	V.a. Limbe- Girdle	7/8	8,8	3,6	14,2	162	1,3
25	16	w.	V.a. Kugelberg- Welder	7	5,0	4,9	9,1	198	1,3

(V.a. = Verdacht auf)

Ergebnisse und Bewertung:

Die für die drei verschiedenen Altersstufen ermittelten Normalbereiche der 5'-Nukleotidase mit der verwendeten Methode nach Persijn et al. wurden nach den in Tabelle 4 - 6 aufgeführten Einzelwerten gemäß der internationalen Definition (Normalbereich = $\bar{x} + 2s$, wobei $\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert, s = Standardabweichung) bestimmt.

Tabelle 4, Normalprobanden - Erwachsene (17 - 54 J.)

Geschlecht	Alter	5'NTD
m.	26	3,76
m.	29	3,48
m.	26	4,66
w.	54	5,27
m.	51	3,91
w.	25	5,48
m.	26	4,72
w.	49	6,62
m.	26	3,42
m.	17	2,48
Durchschnittsalter:	33	$\bar{x} = 4,38$; Normalbereich: 1,8 - 7

Tabelle 5, Normalprobanden - Kinder (6 - 10 J.)

Geschlecht	Alter	5'NTD
m.	10	3,65
m.	9	4,33
w.	7	2,88
w.	9	3,07
w.	9	4,86
m.	8	4,28
w.	8	2,90
w.	9	3,67
w.	9	2,13
w.	10	2,84
Durchschnittsalter:	9	$\bar{x} = 3,46$; $s = 0,67$; Normalbereich: 2,1 - 4,8

Tabelle 6, Normalprobanden - Kinder (11 - 16 J.)

Geschlecht	Alter	5'NTD
m.	13	2,36
m.	11	3,00
w.	12	2,20
w.	12	3,47
m.	11	4,63
w.	12	3,07
w.	11	4,49
m.	14	1,42
w.	11	2,66
Durchschnittsalter:	12	$\bar{x} = 3,04$; $s = 0,93$; Normalbereich: 1,2 - 4,9

Verglichen mit dem von Persijn et al. (24) angegebenen Normalbereich von 5,5 - 11,5 mU/ml fielen die in dieser Arbeit bestimmten Werte etwa um die Hälfte niedriger aus. Price et al. (28) bestimmten jedoch im Jahre 1971 nach derselben Methode bei 100 Angehörigen des Krankenhauspersonals (56 Männer, 44 Frauen) bei einem Mittelwert von 7,9 mU/ml einen Normalbereich von 1,8 - 14,0 mU/ml. Bei einem weiteren Kollektiv von 30 Krankenhauspatienten ohne Störung des hepatobiliären Systems bestimmten sie einen Durchschnittswert von 3,5 mU/ml. Somit liegen die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Normalwerte durchaus im Rahmen der in der Literatur angegebenen Werte.

Der Mittelwert der Erwachsenen von 4,4 mU/ml liegt deutlich über dem Mittelwert der Kinder mit 3 u. 3,5 mU/ml, was die Beobachtungen von Belfield u. Goldberg (6) bestätigt. Der von ihnen ebenfalls beobachtete geringfügig niedrigere Mittelwert der Altersgruppe von 11 - 16 Jahren gegenüber der Gruppe von 6 - 10 Jahren konnte auch nachgewiesen werden.

Demgemäß wurden die untersuchten Patienten mit Muskelschwund ebenfalls in diese drei Altersgruppen unterteilt.

Tabelle 7, Patienten (17 Jahre und älter)

Nr. nach Tab. 3	5'NTD
1 +)	3,74
2 +)	2,83
3 +)	2,66
4 +)	2,77
5 +)	2,93
6 +)	4,02
7	2,64
8	5,73

$$\bar{x} = 3,41$$

+) eingefrorene Seren

Tabelle 8, Patienten (6 - 10 Jahre)

Nr. nach Tab. 3	5'NTD
9	2,59
10	4,78
11	4,95
12	5,12
13	3,88
14	4,59
15 ⁺)	2,87

$$\bar{x} = 3,82$$

⁺) eingefrorenes Serum

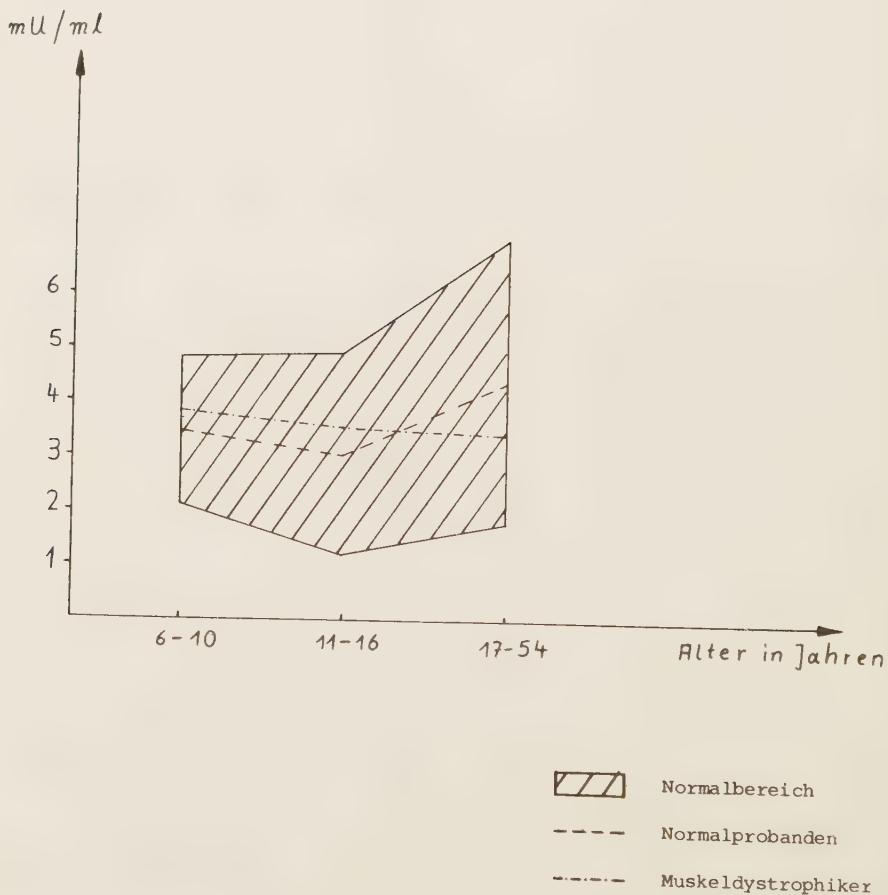
Tabelle 9, Patienten (11 - 16 Jahre)

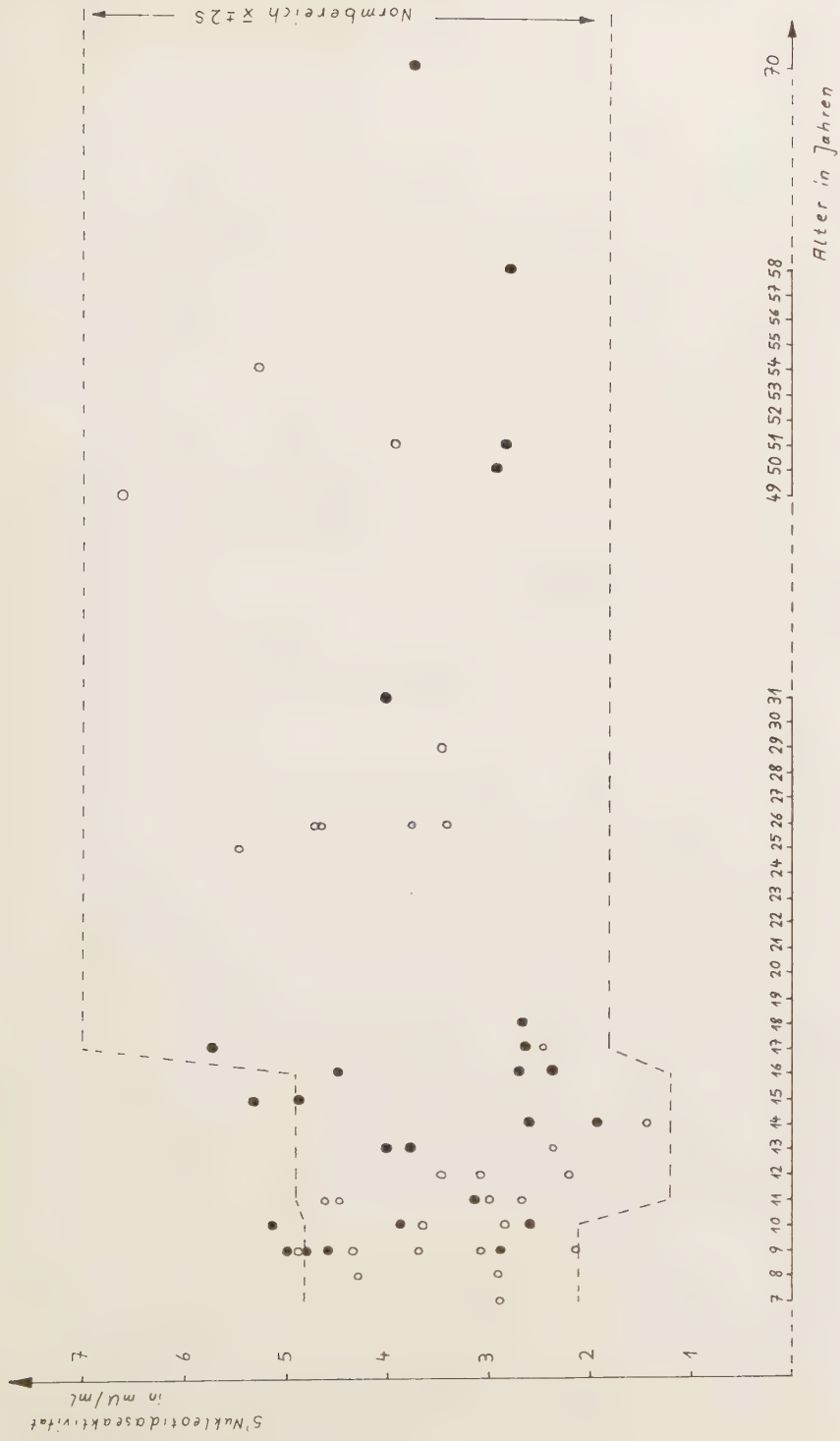
Nr. nach Tab. 3	5'NTD
16 ⁺)	3,14
17	3,77
18	1,91
19	4,00
20	2,70
21	5,34
22	4,89
23	4,50
24	2,60
25	2,36

$$\bar{x} = 3,52$$

⁺) eingefrorenes Serum

Graphische Darstellung des ermittelten Normalbereichs der 5'-Nukleotidaseaktivität sowie der Mittelwerte von Normalprobanden (----) und Muskeldystrophikern (-.-.-.-)





Graphische Zusammenfassung der 54 Einzelmessungen

Bis auf drei geringfügig erhöhte 5'-Nukleotidasewerte lagen die restlichen 22 Werte alle innerhalb der zugehörigen Normalbereiche. Aus dieser Untersuchung ergibt sich daher kein Anhalt auf eine Veränderung der 5'-Nukleotidase im Serum von Patienten mit progressiver Muskeldystrophie.

Zur Bestimmung der Präzision der angewendeten 5'-Nukleotidase-Nachweis-Methode wurde in den 54 durchgeführten Doppelbestimmungen der Einzelproben ein mittlerer Variationskoeffizient von 5,4 mit den Extremwerten 0 - 13,7 ermittelt.

D i s k u s s i o n

Trotz umfangreicher Enzymaktivitätsmessungen im Serum bei progressiver Muskeldystrophie, wie z.B. von Luif et al. (18) oder wie bei Heyck und Laudahn (15) zusammengestellt, wurde die zur Klärung der Pathogenese der Muskeldystrophie vielfach in Erwägung gezogene 5'-Nukleotidase bei der progressiven Muskeldystrophie im Serum erst einmal in der Literatur bestimmt.

Danach fand Chowdhury (11) bereits im Jahre 1962 die nach der aus dem Jahre 1953 stammenden Methode von Dixon und Purdom (13) noch in Bodansky Units angegebene 5'-Nukleotidaseaktivität im Serum von 22 Patienten mit progressiver Muskeldystrophie nicht erhöht.

Hiermit steht er in gewisser Weise in Widerspruch zu Beckett, Bourne und Golarz (1, 7, 8) , die bereits 1959 im proliferierenden Endo- und Perimysium bei progressiver Muskeldystrophie histochemisch eine erhöhte 5'-Nukleotidaseaktivität gegenüber normalem menschlichem Muskelbindegewebe festgestellt hatten.

Gemäß der Theorie von Beckett, Bourne und Golarz, wonach der Untergang von Muskelgewebe durch die vom Bindegewebe in die Muskelfaser penetrierende 5'-Nukleotidase bedingt sein soll, wäre doch zu erwarten gewesen, daß die 5'-Nukleotidase über die interzelluläre Flüssigkeit auf ihrem Weg aus dem Bindegewebe zur Muskelfaser auch im Serum in erhöhter Konzentration in Erscheinung tritt.

Gestützt wurden die Ergebnisse von Chowdhury dann 1965 durch Mc Caman (19) , der bei muskeldystrophischen Mäusen die 5' Nukleotidase im Homogenat zwar pro Gramm Protein vierfach erhöht, bezogen auf das Muskelgesamtgewicht, jedoch nahezu unverändert fand.

Den Widerspruch zwischen sich und Bourne führte Mc Caman darauf zurück, daß Bourne die 5' Nukleotidaseaktivität im Homogenat pro Gramm Protein und nicht pro Gramm Muskel angibt. Der Proteingehalt des dystrophischen Muskels macht aber nach seinen Untersuchungen nur ein Viertel des normalen Muskels aus, weshalb die 5' Nukleotidaseaktivität nicht vierfach erhöht, sondern aufgrund des Proteinschwunds mengenmäßig unverändert vorliegt.

Dagegen konnten Shanta, Golarz und Bourne (29) 1968 an Meerschweinchen und Katzen erneut verschiedene Gruppen dephosphorylierender Enzyme in der Muskelspindel nachweisen, welche vielleicht eine Rolle als stoffwechselaktive Diffusionsschranke spielen könnte.

1973 bestätigten dann Kar und Pearson (16) ebenfalls mit histochemischen Methoden am Muskelhomogenat, allerdings wiederum bezogen auf das im Muskel enthaltene Protein, die von Bourne und Golarz sowie Pennington (22, 21) beschriebene Erhöhung der 5' Nukleotidaseaktivität bei progressiver Muskeldystrophie und gaben sie gleichzeitig erstmals zahlenmäßig an. Aus den Ergebnissen schlossen sie erneut auf einen Zusammenhang zwischen erhöhter 5' Nukleotidaseaktivität und Fibrosierung im Muskel.

Schließlich gelang De Reuck (12) 1974 der Nachweis am Menschen, daß die Außenmembran von verdickten Muskelspindelkapseln, wie sie vermehrt bei progressiver Muskeldystrophie vorkommen, reich, die Innenmembran dagegen arm an 5' Nukleotidase ist. Weiterhin kam er zu dem Ergebnis, daß selbst im

Terminalstadium der Muskeldystrophie unter anderem auch noch nahezu normale Muskelspindeln gesehen werden, die von einer großen Menge Fett umgeben sind, welches reich an 5'-Nukleotidase sein soll.

Während nun diese neueren Untersuchungen teilweise die Arbeit von Bourne und Golarz aus dem Jahre 1959 zu stützen scheinen und eine Überprüfung der Ergebnisse von Mc Caman und Chowdhury nötig machen, spricht die vorliegende Arbeit, die die Ergebnisse von Chowdhury bestätigt, eher für die Arbeit von Mc Caman, wonach eine Erhöhung der 5'-Nukleotidase im Muskel als Ursache der progressiven Muskeldystrophie ausscheidet.

Um das Problem der 5'-Nukleotidaseaktivität im Muskel zu klären, bedarf es nun einer exakten komparativen Bestimmung der 5'-Nukleotidaseaktivität im Homogenat, sowohl auf das Protein als auch auf das Muskelgesamtgewicht bezogen.

Sollte sich dabei die Arbeit von Mc Caman nicht bewahrheiten, d.h. sollte die 5'-Nukleotidase auch in bezug auf das Muskelgesamtgewicht erhöht sein, so müßte genauer danach geforscht werden, warum die 5'-Nukleotidase nicht auch im Serum erhöht vorliegt.

Danach dürfte es in den Rahmen des Möglichen rücken, eine Aussage über die Bedeutung der 5'-Nukleotidase bei der Ätiologie der progressiven Muskeldystrophie, speziell der Bindegewebshypothese, zu machen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Zur Beurteilung des Stellenwertes der Bindegewebshypothese von Bourne und Golarz bei der Suche nach Ätiologie und Pathogenese der progressiven Muskeldystrophie wurde an 22 Patienten mit progressiver Muskeldystrophie und an 3 Patienten mit neuralen Muskelatrophien die 5' Nukleotidase im Serum mit der zur Zeit genauesten Nachweismethode bestimmt und mit den von einer gesunden Kontrollgruppe nach denselben Kautelen gewonnenen Normalwerten verglichen. Die von Belfield und Goldberg angegebenen altersabhängigen Unterschiede in der 5' Nukleotidaseaktivität im Serum konnten bestätigt und berücksichtigt werden.

Bei der erstmals in U/l angegebenen 5' Nukleotidaseaktivität im Serum von Patienten mit progressiver Muskeldystrophie ergab sich kein Anhalt auf eine Veränderung der 5' Nukleotidaseaktivität bei dieser Erkrankung, womit die Ergebnisse von Chowdhury aus dem Jahre 1962 bestätigt werden konnten.

In der Diskussion wird ein Überblick über den gegenwärtigen Stand der Forschung zur 5' Nukleotidaseaktivität im Rahmen der Bindegewebshypothese bei der progressiven Muskeldystrophie gegeben.

- 7 Bourne G. H. Human Muscular Dystrophy as an Aberration of
Golarz M. N. the Connective Tissue
Nature (London) Vol. 183 : 1741 - 43 (1959)
- 8 Bourne G. H. Histochemical evidence for a possible primary
Golarz M. N. biochemical lesion in muscular dystrophy
Journal of Histochemistry and Cytochemistry
11 : 286 (1963)
- 9 Buddecke E. Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter (Berlin - New York)
3. Aufl. : 125 (1973)
- 10 Campbell D. M. Determination of 5' Nucleotidase in Blood serum
Biochemical Journal 82 : 84p (1962)
- 11 Chowdhury S. R. Serum enzyme studies in muscular dystrophy
Pearson C. M. III. Serum malic Dehydrogenase, 5' Nucleotidase
Fowler W. W. and Adenosinetriphosphatase
Proceedings of the Society for Experimental
Biology and Medecine (New York) 109 : 227 (1962)
- 12 De Reuck J. The Pathology of the human muscle spindle.
A light microscopic, biometric and histochemical
study
Acta Neuropathologica (Berlin) 30 : 43 - 50 (1971)

- 13 Dixon T. F. Serum 5' Nucleotidase
Purdom M. Journal of Clinical Pathology 7 : 341 - 43 (1954)
- 14 Hardonk M. J. 5' Nucleotidase, II. The significance of
Koudstaal J. 5' Nucleotidase in the Metabolism of Nucleotides
studied by histochemical and biochemical Methods
Histochemie 12 : 18 - 28 (1968)
- 15 Heyck H. Die progressiv dystrophischen Myopathien
Laudahn G. Springer (Berlin - Heidelberg - New York) 1969
- 16 Kar N. C. 5' Nucleotidase Activity of Normal and Dystrophic
Pearson C. M. Human Muscle
Proceedings of the Society for Experimental
Biology and Medicine (New York)
143 : 1125 - 26 (Sept. 1973)
- 17 Leybold K. Kinetische Bestimmung der 5' Nukleotidase im Serum
Beckmann J. Zeitschrift für klinische Chemie und klinische
Weisbecker L. Biochemie, 7. Jg. : 25 - 27 (Jan. 1969)
- 18 Luif A. Beiträge zur progressiven Muskeldystrophie.
Sluga E. II. Enzymaktivitätsänderungen im Serum bei
Moser K. progressiver Muskeldystrophie.
Wiener klinische Wochenschrift Nr. 7 : 109 - 113
(19. Februar 1971)
- 19 Mc Caman M. W. Effects of Denervation on Normal and Dystrophic
Mc Caman R. E. muscle
American Journal of Physiology 209 : 495 - 500
(Sept. 1965)

- 20 Niebroj - Dobosz J.
Jedrzejowska H.
Hetnarska L. Blood enzymes in Duchene's progressive muscular dystrophy and their correlation with the clinical and histological pictures
Acta medica Polona XI, 4 : 26 - 29 (1970)
- 21 Pennington J. R. Research in muscular Dystrophy (Proc. 2nd Symp.)
Pitman (London) p. 159 (1963)
- 22 Pennington J. R. Biochemical Aspects of Muscle Disease
Advances in Clinical Chemistry (New York)
14 : 409 - 451 (1971)
- 23 Persijn J. - P.
van der Slik W.
Kramer K.
de Rujter C. A. A new method for the Determination of Serum Nucleotidase
Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie, 7. Jg. : 119 (März 1969)
- 24 Persijn J. - P.
van der Slik W.
Timmer C. J.
Bon A. W. M. A new method for the Determination of Serum Nucleotidase, II. A Simplified Procedure
Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie, 7. Jg. : 199 (März 1969)
- 25 Persijn J. - P.
van der Slik W.
Bon A. W. M. A new method for the Determination of Serum Nucleotidase, III. Inhibition of alkaline phosphatase
Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie, 7. Jg. : 493 - 497 (Sept. 1969)

- 26 Persijn J. - P. A new method for the Determination of Serum
 van der Slik W. Nucleotidase, IV. Evaluation of the conditions
 Timmer C. J. for assays using adenosine deaminase.
 Reijntjes C. M. Zeitschrift für klinische Chemie und klinische
 Biochemie, 8. Jg. : 398 - 402 (Juli 1970)
- 27 Pösch H. Eine Muskeldystrophie auf einem altägyptischen
 Becker P. E. Relief
 Nervenarzt 26 : 528 (1955)
- 28 Price C. P. A comparison of two colorimetric procedures for
 Hill P. G. the assay of 5' Nucleotidase
 Sammons H. G. Clinica Chimica Acta 33 : 260 - 263 (1971)
- 29 Shanta T. H. Histological and histochemical observations on
 Golarz M. N. the capsule of the muscle spindle in normal and
 Bourne G. H. denervated muscle
 Acta anatomica (Basel) 69 : 632 - 646 (1968)
- 30 Shaw R. F. Serum Enzymes and Prognosis in Muscular Dystrophy
 The Lancet April 24, 1971 : 856 - 857
- 31 van der Slik W. Serum 5' Nucleotidase
 Persijn J. - P. Clinical Biochemistry 3 : 59 - 80 (1970)
 Engelsman E.
 Riethorst A.

Lebenslauf

Ich, Klaus Baier, wurde als erster von drei Söhnen des Kraftfahrzeugmeisters Kurt Baier und seiner Ehefrau Renate Baier geb. Neumann am 31. August 1950 in Busdorf Kreis Schleswig geboren.

Nach der Übersiedlung meiner Eltern nach Sindelfingen trat ich dort in die Grundschule ein. Mein Schulweg führte mich über die Realschule in das neusprachliche Gymnasium. Im Sommer 1971 legte ich am Hegel-Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen das Abitur ab.

Wegen des Numerus clausus begann ich mein Medizinstudium zum Wintersemester 1971/72 in Frankreich an der Universität Louis Pasteur zu Straßburg.

Nachdem ich im Februar 1973 die naturwissenschaftliche Vorprüfung für Ärzte vor dem Prüfungsausschuß der Universität Köln als Externer bestanden hatte, setzte ich mein Studium an der Freien Universität Berlin fort. Nach dem Physikum wechselte ich zum Wintersemester 1974/75 an die Ludwig-Maximilians-Universität München über, wo ich die drei Abschnitte der Ärztlichen Prüfung absolvierte.

